云 南 植 物 研 究 2000，22（4）：461～466
Acta Botanica Yunnanica

热带落叶树降香黄檀次生韧皮部薄壁组织细胞超微结构的季节变化*

谭海燕，郝秉中，吴继林**
（中国热带农业科学院橡胶栽培研究所，农业部热带作物栽培生理学重点开放实验室，海南 儋州，571737）

摘要：利用透射电子显微镜技术研究了热带落叶树降香黄檀（*Dalbergia odorifera* T. Chen）末端小枝次生韧皮部韧皮和射线薄壁组织细胞的季节变化。这些变化主要表现为细胞内贮藏物质（其中包括中央液泡中的贮藏蛋白质，质体中的淀粉粒、类脂球和铁蛋白，以及圆球体中的类脂等）的周期性的积累和消耗。降香黄檀在冬季落叶期不出现在温带落叶树木中看到的与抗寒有关的若干细胞学改变。降香黄檀也象温带树木一样，薄壁细胞在落叶期形成高度折叠的质膜，并由此形成无数的小泡。有人认为，温带树木中的这些结构与抗寒有关，但我们认为，它们在热带树木中的作用可能是实现细胞间物质的转运。降香黄檀与温带树木薄壁细胞季节变化的差异可以解释为它们对各自生存环境条件的适应。

关键词：热带树木；韧皮部；液泡；贮藏蛋白质；质体；质膜；降香黄檀
中图分类号：Q 942 **文献标识码**：A **文章编号**：0253－2700(2000)04－0461－09

Seasonal Ultrastructural Changes of Secondary Phloem Parenchyma Cells in a Tropical Tree，*Dalbergia odorifera*

TAN Hai－Yan，HAO Bing－Zhong，WU Ji－Lin
(*Key Laboratory of Ministry of Agriculture for Tropical Crops Physiology*，*Rubber Cultivation Research Institute*，*Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences*，Danzhou，Hainan 571737，China)

Abstract：The seasonal changes of the ray and phloem parenchyma cells of secondary phloem in terminal branchlets of *Dalbergia odorifera* T. Chen (Papilionaceae)，a tropical deciduous tree，were studied by using transmission electron microscopy. The changes were mainly the cyclic alternation of accumulation and exhaustion of the storage materials including proteins in the central vacuole，the starch grains，lipoid globules and phytoferritin in the plastids，and lipoids in the spherosomes. *D. odorifera* did not undergo some of the cytological changes which were found in the temperate trees studied and believed to be related with the hardiness. Like the stuctures found in temperate trees，in *D. odorifera* the highly folded plasmalemma and numerous small vesicles pinched of by the plasmalemma appeared in the actively reserve－accumulating cells during the leaf－fall period. It was suggested that the structures play a role in translocation of the materials between the cells，while in the temperat trees the structures were considered involving in frost resistance. The differences in seasonal ultrastructural changes between D. odorifera and the temperate tree can be ex-

* 基金项目：国家自然科学基金资助项目（39460005）
** 通讯联系人
收稿日期：1999－12－21，2000－03－08 接受发表

plained by adaptation of the trees to climatic conditions in their habitats.

Key words：Tropical tree；*Dalbergia odorifera*；Phloem；Vacuole；Storage proteins；Plastid；Plasmalemma

随着一年中气候的有规律变化，树木生长通常发生活跃的生长期和休眠期的交替。这种树木生长的季节变化除表现在树木细胞的生理、生化的改变外，也表现在细胞超微结构的改变上。在温带落叶树木树皮细胞的超微结构季节变化的研究中，强调了这些细胞如何在秋冬季节获得抵抗低温和霜冻的能力（Pomeroy 等，1971；Niki 等，1981；Wisniewki 等，1986）。

热带落叶树木的生长也表现出季节变化。由于热带地区气候与温带地区非常不同，因此热带落叶树木的季节变化，必定具有适应热带环境条件的若干特点。至今关于热带树木韧皮部超微结构季节变化的知识还很少。最近在一些热带树木（包括降香黄檀）茎维管组织贮藏蛋白质的细胞的观察中，发现这些薄壁细胞在树木落叶—无叶期和在生长期一样保持着中央大液泡，其中积累着蛋白质物质（Wu 等，1986，1987，1991；Hao 等，1993；郝秉中等，1997）。这与观察过的温带落叶树不同，后者的贮藏蛋白质的细胞仅在生长季具有中央大液泡，它们在休眠期被无数的小液泡所代替，这些小液泡内含有蛋白质而被称为蛋白体（Greenwood 等，1990；Wetzel 等，1989a，1989b，1991）。本文以热带落叶树木降香黄檀为材料，进一步研究热带树木次生韧皮部薄壁组织细胞季节变化的超微结构特点。

1 材料和方法

1.1 植物材料

实验树降香黄檀（*Dalbergia odorifera* T. Chen）属蝶形花科（Papilionacae），栽培在我院的经济植物园内。从 1993 年 8 月～1995 年 10 月，在进行物候观测的同时，从 3 株 20 年生树的 1～2 年生末端小枝上采集树皮标本。每隔 2 月采集一次，每株树采集 3 个末端小枝。此外还在落叶期、无叶期，以及芽萌动期不定期的采集末端小枝树皮标本。物候期划分和观测时间参考宛敏渭和刘秀珍（1979）。

1.2 电子显微镜技术

切下的标本立即浸入用冰冷却的 4% 戊二醛（0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 pH7.2）中预固定约 0.5 h，然后将标本切割成适当的大小，在上述戊二醛溶液中 4℃下固定 12 h，并在 2% OsO4（缓冲液同前）室温下后固定 6 h，然后将标本在系列乙醇中脱水，并包埋在 Epon 812中。用 LKB－Ⅴ超薄切片机切片，切片用醋酸铀和柠檬酸铅染色，用 JEM100－CXⅡ电镜观察。

2 结果

在采集标本的两年中，采集树的物候和生长情况如下：12 月下旬开始落叶，2 月上旬至 3 月中下旬为无叶期，3 月下旬至 4 月中旬芽萌动和抽新梢，5 月至 10 月径围迅速增长，并抽更多新梢，11 至 12 月径围增长变慢。我们发现与树木生长节律相配合，次生韧皮部薄壁组织细胞（包括韧皮薄壁组织细胞和射线薄壁组织细胞，以下简称韧皮部薄壁细

胞）的超微结构发生明显的季节变化。

2.1　落叶期和无叶期

在落叶期树皮内层次生韧皮部薄壁细胞大量积累贮藏物质，至无叶期贮藏物质积累达到顶峰。薄壁细胞中最重要的贮藏物质之一是贮藏蛋白质，它们在不同细胞中超微结构的形态有所不同：在大多数的细胞中呈纤维状，均匀分布于中央大液泡，在另一些细胞中呈电子致密的无定形小块状，不规则的分散于中央大液泡（图版Ⅰ:1 并参考 Hao 等，1993）。贮藏蛋白质在韧皮部中从外开始向内（接近形成层方向）积累：在开始落叶时，紧挨形成层的细胞还没有大量积累贮藏蛋白质，到无叶期，包括形成层细胞在内的韧皮部薄壁细胞都含有丰富的贮藏蛋白质（图版Ⅰ：1）。在落叶期，贮藏蛋白质细胞的周缘细胞质内含有很多小泡，其内含有像中央大液泡那样的蛋白质物质（图版Ⅰ：2，3）；这种含蛋白质的小泡可能与贮藏蛋白质在中央大液泡的积累有关（吴继林等，1997）。在无叶期，在细胞中很少观察到这些含蛋白质的小泡。另一重要贮藏物质是含在质体中的淀粉粒。在落叶期的薄壁细胞，特别是射线细胞中，质体数目增多，其中含有许多充分发育的淀粉粒，还有若干类脂球、铁蛋白（铁蛋白的辨认根据吴继林和郝秉中，1990）和一些片层状结构（图版Ⅰ：1，2）。在整个无叶期，质体的数目和其中淀粉粒的数量和大小没有明显变化。此外，在落叶期和无叶期，都有很多圆球体存在于细胞的周缘细胞质中（图版Ⅰ：2）。

薄壁细胞在落叶和无叶期，含有丰富的自由核糖体、许多粗糙内质网，一些微体和高尔基体，以及许多线粒体（图版Ⅰ：2，3）。在落叶期，质膜的特点是具有高度发展的折叠状结构，而且它们在周缘细胞质中形成大量小泡（图版Ⅰ：3，4）。这种质膜折叠形成的小泡有些并入含蛋白质小泡中（图版Ⅰ：3），有些则并入中央大液泡（图版Ⅰ：4）。这种折叠状的质膜和它们形成的小泡在落叶开始时出现，直至无叶期早期都可以看到，此后这些结构消失（图版Ⅰ：5）。落叶期的细胞在质膜与细胞壁之间常有许多小管状和其它形状的结构，它们也可以随折叠的质膜并入中央液泡（图版Ⅰ：4）。

2.2　芽萌动和新梢生长期

该物候期薄壁细胞超微结构的特点是各种贮藏物质被迅速的消耗。中央大液泡中贮藏蛋白质的降解首先发生在形成层及其附近的薄壁细胞中（图版Ⅱ：6），然后再扩展到远离形成层的细胞。当液泡蛋白质开始降解时，原先被蛋白质均匀填满的液泡出现大小不等的空隙（图版Ⅱ：7）。如果原有的液泡蛋白质是无定形的块状电子致密物，随着蛋白质降解，这些块状电子致密物变小。到抽新梢后期，原先的贮藏蛋白质几乎全部消失，中央液泡中仅存一些稀疏的均匀分布的纤维状物质（图版Ⅱ：8，9）。在贮藏蛋白质降解的同时，质体也发生很大变化。在抽新梢的后期，质体数目减少，常常看到质体的双层被膜部分降解或完全消失，淀粉粒变小，类脂体和铁蛋白部分或完全消失，有时在质体内看到电子致密物和原片层体状结构（图版Ⅱ：8，9），此外，细胞中较少看到圆球体（图版Ⅱ：7，9）。

在该物候期薄壁细胞的周缘细胞质内含有大量自由核糖体和丰富的内质网，也经常发现线粒体和高尔基体。这时的质膜保持光滑状态（图版Ⅱ：7，9）。

2.3　径围迅速生长期

这时薄壁细胞逐渐积累各种贮藏物质。贮藏蛋白质最先沉积在远离形成层的薄壁细胞中（图版Ⅲ：10），而形成层细胞的中央液泡中仅有非常稀疏的纤维状物质（图版Ⅲ：

11)。当直径生长变慢时，除形成层细胞外，薄壁细胞的中央大液泡中已积累大量贮藏蛋白质，与此同时，质体中大量积累淀粉（图版Ⅲ：12)，圆球体数目也增加。

在该物候期，薄壁细胞中的其他细胞器没有显著改变，质膜保持比较光滑状态（图版Ⅲ：10)。

3 讨论

本研究证明，降香黄檀小枝次生韧皮部薄壁组织细胞超微结构的季节变化主要表现为贮藏物质周期性的积累和消耗。这些贮藏物质包括中央液泡中的蛋白质，质体中的淀粉粒、类脂球和铁蛋白，还有圆球体中的类脂。它们在径围生长期开始积累，在落叶和无叶期数量上达到顶峰，在芽萌动—抽新梢期从韧皮部内层消失。与贮藏物质的变化一致，有关的细胞器也发生若干改变。

将热带落叶树降香黄檀的这种季节变化与已经研究过的温带落叶树进行比较，可看出它们之间的异同。不论是降香黄檀，还是温带落叶树都随季节改变而发生贮藏物质的周期循环。然而根据对温带树的树皮薄壁组织细胞的研究，认为它们在越冬期间的如下超微结构变化与抵抗低温和霜冻有关（Sakai and Larcher，1987)：（1）在越冬期中央大液泡转变成大量小液泡；(2）质体中的淀粉转化成糖；(3）质膜从相对光滑状态转变为高度折叠的状态。降香黄檀不发生前两种变化，此外虽然降香黄檀在落叶期也形成折叠的质膜，但其生理作用可能与温带树木不同，这将在下面讨论。

关于韧皮部薄壁组织细胞质膜从光滑状态向折叠状态的季节性转变，Pomeroy 等（1971）发现在刺槐（*Robinia pseudoacacia*）中质膜的这种变化与植株抗霜冻密切相关。他们推测，冬季质膜高度折叠的状态有利于水分的流出并能减轻冰冻融解过程中收缩和膨胀对质膜的伤害。Krasowski 等（1990）发现花旗松（*Psendotsuga menziesii*）幼苗在冬季或将幼苗置于冰点下温度，苗端细胞也会出现折叠的质膜。简令成等（1991）证明在小麦苗抗寒锻炼期，其叶内细胞的质膜高度折叠以致与液泡膜相连接，并认为凹陷的质膜形成了排水通道。然而 Niki 等（1981）发现桑树（*Morus bombyciz*）枝条的皮层薄壁细胞的质膜在冬季中期仍然是光滑的，因而怀疑高度折叠的质膜不是极端抗寒细胞的特点。热带树降香黄檀落叶期小枝韧皮部薄壁组织细胞中也发现有质膜高度折叠的现象，但是它很可能与抗寒无关。我们假定这种结构的一个作用是细胞之间物质的转移，主要根据：(1）折叠的质膜在折叠过程中形成了无数的小泡，它们通过内吞作用结合到含蛋白质的小泡或中央液泡中；(2）折叠的质膜和有关的结构主要出现在落叶期，此时发生叶片中大量物质转运回小枝中（Kramer 等，1979)；(3）在无叶期高度折叠的质膜主要出现在活跃进行贮藏物质积累的韧皮部细胞。

降香黄檀和温带落叶树之间薄壁细胞超微结构季节变化的差别，可以用它们对生存地气候条件的适应来解释。对于温带落叶树，为了度过严酷冬季不仅需要积累贮藏物质供应来年生长之用，而且还需要发展很强的抗寒性。根据 Sakai and Larcher (1987)，树木对季节寒冷的适应分为两个阶段：第一个阶段发生在秋季，积累大量的有机物质，为下一阶段作准备；第二阶段发生在寒冷的冬季，伴随着上面叙述的超微结构和生物化学变化在内的一系列改变，植株获得最大的抗寒能力。另一方面降香黄檀是生长在具有湿季和旱季交替

的热带气候条件下，旱季也是一年中相对的低温时期（吴继林等，1992）；虽然干旱和低温不利于植株的生长，但是并不对植株造成伤害（全年无霜冻，最低月平均温度约 18℃）（吴继林等，1992）。降香黄檀在不利环境来临之前，随着落叶和生长停止，大量积累贮藏物质供下一个生长季利用，并不需要发展很强的抗寒性。与此相对应，降香黄檀韧皮部薄壁细胞不发生与抗寒有关的超微结构变化。此外，已知包括降香黄檀在内的许多热带树木在落叶—无叶期保持着与生长期差不多厚度的有输导功能的韧皮部（吴继林等，1992），同时筛分子和伴胞的超微结构也无明显改变（郝秉中等，1997）。这些事实表明，热带树与温带树比较，其细胞和组织在无叶—落叶期的变化是较小的。

〔参 考 文 献〕

吴继林，郝秉中，1990．巴西橡胶树茎次生韧皮部质体中的植物铁蛋白〔J〕．热带作物学报，**11**（2）：27～33

吴继林，郝秉中，1992．海南岛若干落叶树木有功能韧皮部的季节变化〔J〕．云南植物研究，**14**：157～163

吴继林，1992．降香黄檀着叶期和无叶期次生韧皮部筛分子的超微结构〔J〕．植物学报，**34**：360～363

吴继林，郝秉中，谭海燕，1997．降香黄檀次生韧皮部薄壁组织细胞液泡蛋白质形成和积累的超微结构研究〔J〕．云南植物研究，**19**：381～386

宛敏渭，刘秀珍，1979．中国物候观测方法〔M〕．北京：科学出版社，1～136

郝秉中，谭海燕，吴继林等，1997．海南岛白格旱季休眠的解剖研究〔J〕．热带作物学报，**18**（2）：98～107

简令成，孙龙华，1991．抗冻植物避免细胞内结冰机制的探讨——液泡内吞作用和水外排渠道的发现〔J〕．植物学集刊，**5**：107～113

Greenwood J S，Demmers C，Wetael S，1990．Seasonally – dependent formation of protein – storage vacuoles in the inner bark tissues of *Salix microstachya*〔J〕．*Canadian Journal of Botany*，**68**：1747～1755

Hao B Z，Wu J L，1993．Vacuole proteins in parenchyma cells of secondary phloem and xylem of *Dalbergia odorifera*〔J〕．*Trees*，8：104～109

Kramer J P，Kozlowski T T，1979．Physiology of Woody Plants〔M〕．New York：Academic Press，304～314

Krasowski M J，Owens J N，1990．Seasonal changes in the apical zovation and ultrastructue of coast Douglas fir seedlings（*Pseudotsuga menziesii*）〔J〕．*American Journal of Botany*，**72**：245～260

Niki T，Sakai A，1981．Ultrastructural changes related to frost hardiness in the cortical parenchyma cells from *Mulberry twigs*〔J〕．*Plant and cell Physiology*，**22**：171～183

Pomeroy M K，Siminovitch D，1971．Seasonal cytological changes in secondary phloem parenchyma cells in *Robinia pseudaocacia* in relation to cold hardiness〔J〕．*Canadian Journal of Botany*，**49**：787～795

Sakai A，Larcher W，1987．Frost Survival of Plants：Cold Acclimation in Plant〔M〕．Berlin：Springer – Verlag，113～137

Wetzel S，Demmers C，Greenwood J S，1989a．Seasonally fluctuating bark proteins are a potential form of nitrogen storoge in three temperate hardwoods〔J〕．*Planta*，**178**：275～281

Wetzel S，Demmers C，Greenwood J S，1989b．Spherical organelles，analogous to seed protein bodies，fluctuate seasonally in parenchymatous cells of hardwood〔J〕．*Canadian Journal of Botany*，**67**：3439～3445

Wetzel S，Demmers C，Greenwood J S，1991．Protein storage vacuole in inner bark and leaves of softwoods〔J〕．*Tree*，**5**：196～220

Wisniewski M，Ashworth E，1986．A comparison of seasonal ultrasturcture changes in stem tissues of peach（*Prunus persica*）that exhibit contrasting mechanisms of cold hardiness〔J〕．*Botanical Gazette*，**147**：407～417

Wu J L，Hao B Z，1986．Protein – storing cells in secondary phloem of *Hevea brasiliensis*〔J〕．*Kexue Tonbao*，**31**：221～223

Wu J L，Hao B Z，1987．Ultrastructure and differentiation of protein – storing cells in secondary phloem of *Hevea brasiliensis* stem〔J〕．*Annals of Botany*，**60**：505 – 512

Wu J L，Hao B Z，1991．Vacuole proteins in secondary phloem parenchyma cells of three *Meliacea* species〔J〕．*IAWA Bulletin*，**12**：51～56

图 版 说 明

图版Ⅰ：1～4，**无叶和落叶期韧皮部横切面。**1. **无叶期韧皮部内层，表示大量液泡蛋白质在韧皮部和形成层（Ca）细胞中，和许多淀粉粒（SG）在射线细胞（R）中。液泡蛋白质是均匀分散的（白箭）或呈块状（白箭头）。**SG，**淀粉粒；**SE，**筛分子；**X，**木质部。标尺**＝10 μm。2. **落叶期射线细胞，表示充满蛋白质的中央液泡（V），含蛋白质的小泡（PV），质体（P），圆球体（Sp），线粒体（M）和细胞核（N）。质体含淀粉粒（SG）、铁蛋白（F）和类脂球（LG）。标尺**＝2 μm。3，4. **落叶期韧皮薄壁组织细胞，表示折叠的质膜（黑箭头）和由它形成的小泡（黑箭）。图**3**中小泡并入含蛋白质小泡（PV）；图**4**中小泡并入中央液泡（V），小泡中含有小管状结构（T）。**G，**高尔基体。标尺**＝0.5 μm。5. **无叶期韧皮部薄壁组织细胞表示光滑的质膜（PL）。**CW，**细胞壁；**V，**中央液泡。标尺**＝0.3 μm。

图版Ⅱ：6～9，**新梢生长期韧皮部横切面。**6. **新梢生长早期细胞，表示正被降解的液泡蛋白质（黑箭）。**Ca，**形成层；**SE，**筛分子；**X，**木质部。标尺**＝10 μm。7. **新梢生长早期韧皮部薄壁组织细胞，表示原来均匀分布的液泡蛋白质（PV）正被降解。**M，**线粒体；**P，**质体，其中含有小的淀粉粒（SG）和电子致密物（白箭）；**PL，**光滑的质膜；**Sp，**圆球体。标尺**＝2.5 μm。8. **新梢生长晚期细胞，表示液泡蛋白质消失和含有小淀粉粒（白色小粒）的质体（P）。**SE，**筛分子；**R，**射线。标尺**＝10 μm。9. **图**8**中韧皮薄壁组织细胞（星号）的放大。**P，**失去被膜的质体，其中有淀粉粒（SG）和原片层体（PB）；**N，**细胞核；**Sp，**圆球体；**V，**液泡；**PL，**比较光滑的质膜。标尺**＝1 μm。

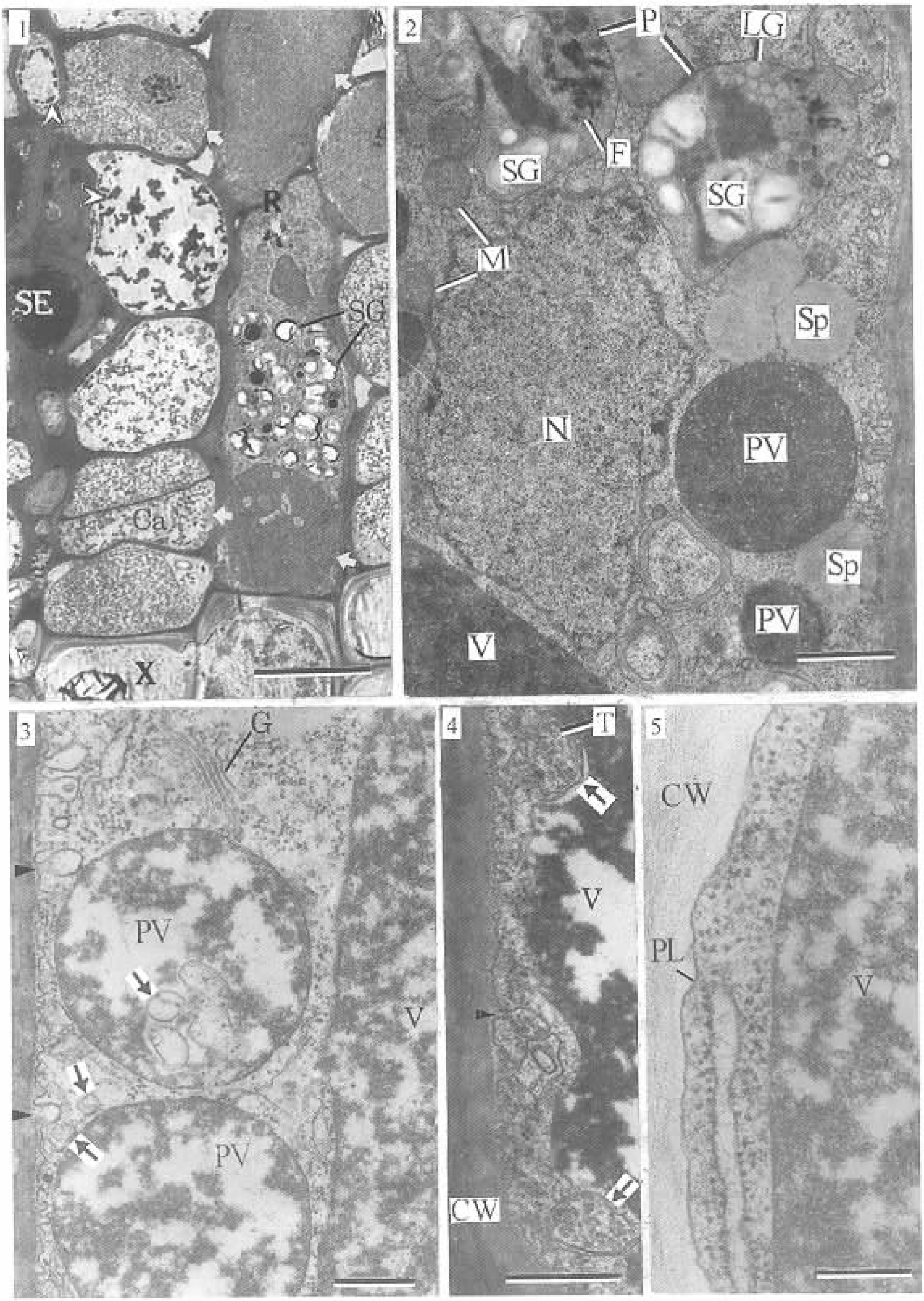
图版Ⅲ：图10～12，**茎围迅速生长期韧皮部横切面。**10. 7**月的韧皮薄壁组织细胞。中央液泡（V）中有少量液泡蛋白（箭头）。**RER，**粗糙内质网；**M，**线粒体；**N，**细胞核；**PL，**比较光滑的质膜。标尺**＝1 μm。11. 7**月的形成层区，细胞中无液泡蛋白质。**SE，**筛分子。标尺**＝5 μm。12. 10**月的韧皮部细胞。大量贮藏物质出现在细胞中。**VP，**液泡蛋白质；**SG，**质体中的淀粉粒；**R，**射线细胞；**SE，**筛分子。标尺**＝5 μm。

Explanation of Plates

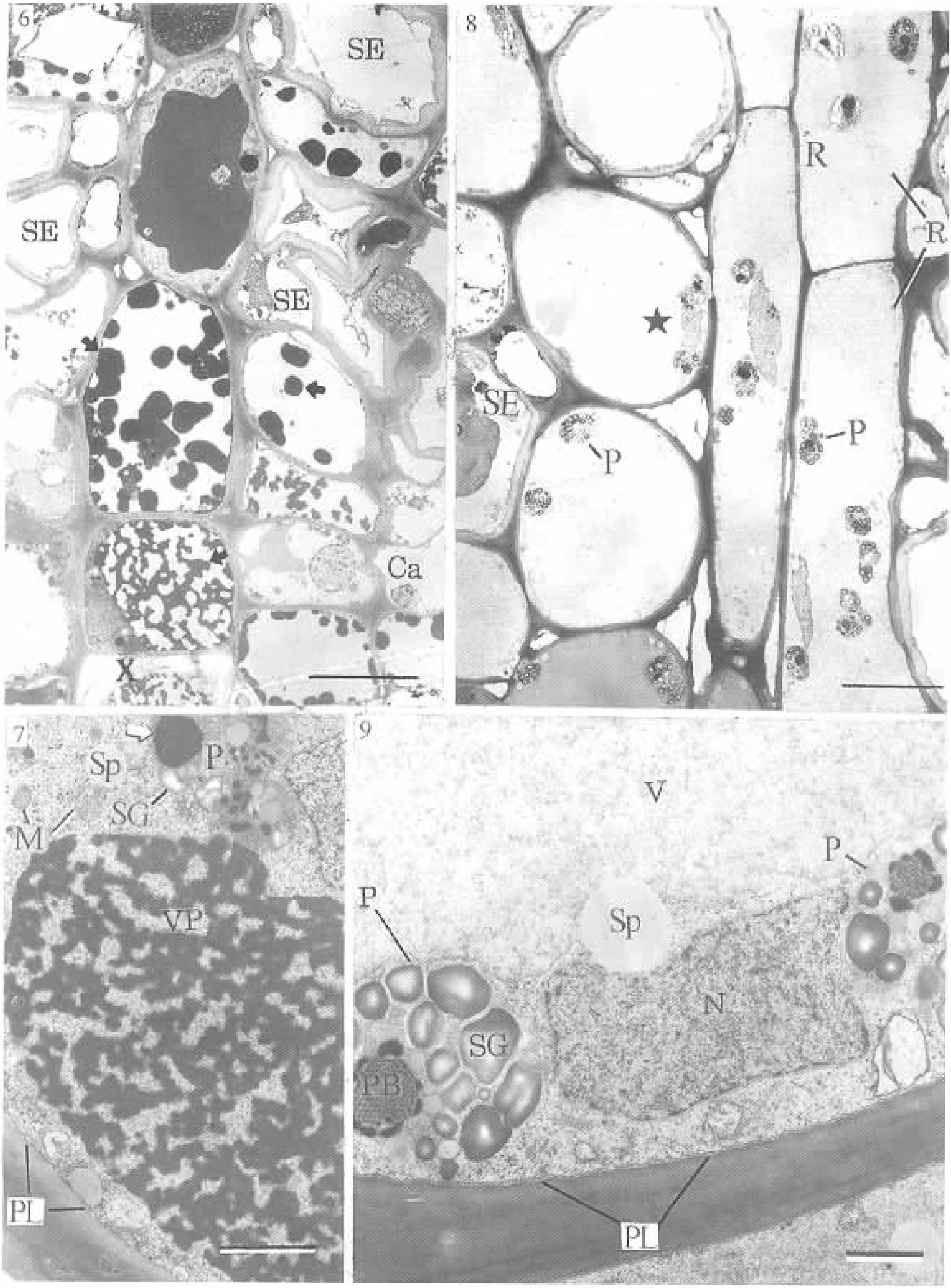
Plate Ⅰ1～5. Transverse sections of phloem cells during leaf fall－leaf absent period. 1. Inner phloem in leaf－absent period showing massive vacuole proteins in phloem and cambium (Ca), and many starch grains (SG) in a ray cell (R). Vacuole proteins appear as even dispersed materials (whire arrow heads) or amorphous electron dense masses (white arrows). R, ray. X, xylem. SE, sieve elements. Bar＝10 μm. 2. Ray cell in leaf－fall period showing central vacuole (V) full of proteins, protein－containing vesicles (PV), plastids (P) with starch grains (SG), lipoid globules (LG) and phytoferritin (F), Spherosomes (Sp), mitochondria (M), and nucleus (N). Bar＝2 μm. 3, 4. Phloem parenchyma cells in leaf－fall period showing folding plasmalemma (Black arrow heads) and small vesicles (black arrows) arising from the plasmalema. The small vesicles are incorporated in protein－containing vesicle (PV) in Fig. 3, and the small vesicles with tubules (T) are incorporated in central vacuole (V) in Fig. 4. G, Golgi apparatus. CW, cell wall. Bar＝0.5 μm. 5. Phloem parenchyma cell in leaf－absent showing smooth plasmalemma (PL). CW, cellwall. Bar＝0.3 μm.

Plate Ⅱ6～9. Transverse sections of phloem cells during bud break－shoot elongation period. 6. Phloem cells at the early period of shoot elongation. Vacuole proteins (arrow) are being digested. Ca, cambial cells. X, xylem cell. R, ray. SE, sieve elements. Bar＝10 μm. 7. Phloem parenchyma cell at the early period of shoot elongation. Vacuole proteins (VP) are being degested which originally appear as even dispersed materials. Plastid (P) has smaller starch grains (SG) and black masses (white arrow). Note relatively smooth plasmalemma (PL). M, milochodria. Sp, spherosome. Bar＝2.5 μm. 8. Phloem cells at the late period of shoot elongation. Vacuole proteins disappear and starch grains (white globules) in plastids (P) become smaller. SE, sieve element. R, ray. Bar＝10 μm. 9. Magnified phloem parenchyma cell from Fig. 8 (star). P, plastids without boundary membrane. SG, starch grains. PB, prolamellar bodies. N, nucleus. SP, spherosomes, V, central vacuole. Note relatively smooth plasmalemma (PL). Bar＝1 μm.

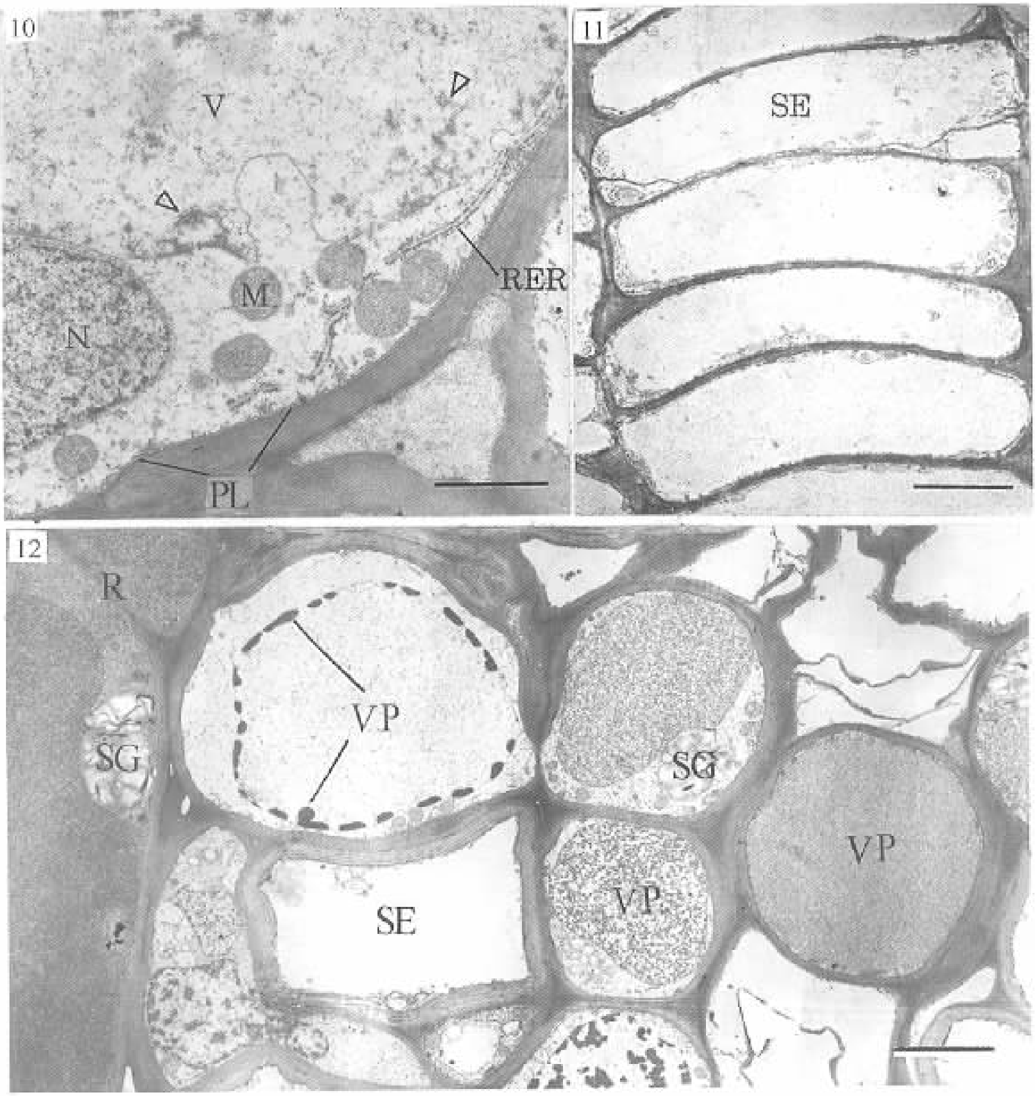
Plale Ⅲ10～12. Transverse sections of phloem during diametral growth period. 10. Parenchyma cell in July. A small quantily of vacuole proteins (arrow heads) appears in central vacuole (V). RER, rough endplasmic reticulum. M, mitochondria. N, nucleus. PL, relatively smooth plasmalemma. Bar＝1 μm. 11. Cambial zone in July. No vacuole proteins in the cells. SE, sieve element. Bar＝5 μm. 12. Phloem cells in October. A large quantity of reserves are accumulated in parenchyma cells. VP, vacuole proteins. SG, starch grains in plastids. R, ray cells. SE, sieve element. Bar＝5 μm.



See explanation at the end of text



See explanation at the end of text



See explanation at the end of text